

## 吡咯喹啉醌对 UVA 诱导人皮肤成纤维细胞衰老的保护作用及机制研究

张春丽<sup>1</sup>, 邹 阳<sup>2</sup>, 林金德<sup>1</sup>, 温传俊<sup>2</sup>, 沈 干<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学附属友谊整形外科医院, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>南京师范大学生命科学学院细胞所, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>南京医科大学第二附属医院整形科, 江苏 南京 210003)

**[摘要]** 目的: 研究吡咯喹啉醌(pyrrroquinoline quinone, PQQ)对 UVA 诱导人皮肤成纤维细胞衰老的保护作用及其机制。方法: 体外使用 6 孔板培养人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblasts, HSF), 予以 9 J/cm<sup>2</sup> 照射, 照射前后实验组加入 80 ng/ml 的 8-甲氧基补骨脂(8-methoxypsoralan, 8-MOP)和浓度为 50、100、200 ng/ml 的 PQQ。UVA 照射 72 h 后, 对细胞进行衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色、JC-1 染色荧光显微镜检测线粒体膜电位变化、JC-1 染色流式细胞仪检测线粒体膜去极化状况、real-time PCR 检测衰老相关基因 mmp1、mmp3 的表达。结果: 低剂量 PQQ(50 ng/ml)实验组  $\beta$ -半乳糖苷酶染色呈阴性, JC-1 染色后低剂量 PQQ(50 ng/ml)实验组细胞线粒体膜电位改变的趋势有回转, JC-1 染色后流式细胞仪检测 PQQ 对 UVA 诱导的衰老细胞线粒体去极化有保护作用, 而且低剂量 PQQ(50 ng/ml)实验组衰老相关基因 mmp1、mmp3 的表达也有明显降低。结论: 吡咯喹啉醌对由 UVA 诱导的人皮肤成纤维细胞衰老有保护作用, 而且这一作用可能是通过线粒体途径发挥作用的。

**[关键词]** 吡咯喹啉醌; UVA 照射; 细胞衰老

**[中图分类号]** R329.25

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)03-337-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130310

## Protective effect and mechanism of pyrroloquinoline quinone (PQQ) against UVA induced human skin fibroblasts aging

Zhang Chunli<sup>1</sup>, Zou Yang<sup>2</sup>, Lin Jingde<sup>1</sup>, Wen Chuanjun<sup>2</sup>, Shen Gan<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Friendship Plastic Surgery Hospital, NJMU, Nanjing 210029; <sup>2</sup>Colleg of Sciences, Nangjing Normal University, Nanjing 210023; <sup>3</sup>Department of Plastic Surgery, the Second Affiliated Hospital to NJMU, Nanjing 210003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the protective effect and mechanism of pyrroloquinoline quinone (PQQ) against UVA induced human skin fibroblasts. **Methods:** Human skin fibroblasts were cultured in 6-well plate *in vitro* with an equal number of cells ( $10^4 \sim 10^6$  per well). HSF exposed to UV irradiation at a dose of 9 J/cm<sup>2</sup>. Pyrroloquinoline quinone (50, 100, 200 ng/ml) and 8-methoxypsoralan (80 ng/ml) were added into the cell culture medium before and after the irradiation. 8-MOP was used to enhance UVA absorption. After 72 hours of irradiation, SA- $\beta$ -Gal staining was performed to evaluate the senescence state, change of mitochondria membrane potential was examined by JC-1 staining using fluorescence microscope, JC-1 staining was also used to test mitochondria membrane depolarization by flow cytometry (FCM), and real-time PCR was used to determine mRNA expression of senescence-associated gene of mmp1, mmp3. **Results:** Cells cultured with lower dosage PQQ (50 ng/ml) exhibited negative SA- $\beta$ -Gal staining. JC-1 staining showed the change of mitochondria membrane potential was reversed by lower dosage PQQ (50 ng/ml). Mitochondria membrane depolarization was relieved lower dosage PQQ (50 ng/ml). Meanwhile, the gene expression of senescence-associated signals of mmp1, mmp3 decreased in PQQ group compared with control group. **Conclusion:** Pyrroloquinoline quinone can protect human skin fibroblasts from aging induced by UVA irradiation via mitochondria pathway.

**[Key words]** pyrroloquinoline quinone (PQQ); UVA irradiation; senescence

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(3): 337-341]

**[基金项目]** 南京医科大学科技发展基金重点项目(2011NJMU242)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: Gogroth@yahoo.com.cn

皮肤是人体重要的天然屏障,保护人体不受外界物理、化学、微生物的侵扰,也是机体衰老的重要指标<sup>[1]</sup>。长波紫外线(UVA)占到达地面紫外线的大部分(90%左右),且穿透力强,可以穿透表皮进入真皮,因此UVA在光老化过程中起到重要作用<sup>[2]</sup>。

吡咯喹啉醌(pyrroloquinoline quinone, PQQ)是一种不依赖于NAD(P)和FAD的葡萄糖脱氢酶辅基,在生物体内可发挥多种生物学作用,能促进动物的生长发育、细胞增殖、保护神经细胞并促进其生长因子的分泌<sup>[3]</sup>。PQQ存在于各类动物细胞及细胞产物中,如牛奶等,其含量在pmol/L及nmol/L水平,但哺乳动物自身并不能合成PQQ,需要以食物补充<sup>[4-5]</sup>。近年来对PQQ的研究越来越多,已经有实验证明PQQ对鱼藤酮、抗霉素A对细胞的损伤有保护作用<sup>[6]</sup>。

本研究主要使用低剂量UVA照射人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblast, HSF),并加入8-甲氧基补骨脂素(8-MOP)增加UVA吸收<sup>[7]</sup>,形成细胞衰老模型。UVA照射前后加入浓度梯度的PQQ,观察PQQ对HSF的保护作用,研究这一作用是通过什么通路进行的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人皮肤成纤维细胞(无锡博慧斯生物医药科技有限公司)。PQQ、8-MOP(Sigma公司,美国)。DMEM培养基(Wisent公司,加拿大)。胎牛血清(Gibco公司,美国)。细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶试剂盒、JC-1(杭州碧云天生物技术研究所)。荧光实时定量引物(上海生工生物工程股份有限公司)。荧光实时定量试剂盒(大连宝生物工程有限公司)

细胞培养箱(Thermo公司,美国),生物安全柜(The Baker Company公司,美国),紫外光疗仪SS-04A(上海希格玛高技术有限公司)等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\beta$ -半乳糖苷酶染色

将HSF用含有15%胎牛血清的高糖DMEM培养液培养,按照每个孔 $1 \times 10^5$ 个细胞接种入6孔板。按照终浓度8-MOP 80 ng/ml, PQQ 50、100、200 ng/ml加入HSF培养液中。药物处理后24 h,除去培养液, PBS冲洗3遍,加入500  $\mu$ l PBS,以9 J/cm<sup>2</sup>剂量照射药物处理后HSF细胞。

UVA光波波长范围为:340~400 nm,光照强度为: $10 \times 10^3 \mu$ w/cm<sup>2</sup>,辐照剂量=辐照强度 $\times$ 辐照时

间。使用的辐照剂量是9 J/cm<sup>2</sup>。

UVA照射后相应对照组细胞加入PQQ 50、100、200 ng/ml,照射72 h后对细胞进行活体染色,染色按照试剂盒说明书操作。

#### 1.2.2 real-time 法检测衰老标志基因 mmp1、mmp3 的表达

细胞培养、药物处理、UVA照射同1.2.1。UVA照射72 h后,TRIzol试剂提取细胞总RNA,纯化、定量。总RNA含量为0.5  $\mu$ g, 20  $\mu$ l反应体系反转录为cDNA。所得cDNA稀释10倍后,按照20  $\mu$ l反应体系扩增。95 $^{\circ}$ C预变性5 min,随后95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 40个循环,最后72 $^{\circ}$ C充分延伸10 min。以 $\beta$ -actin为内参,根据循环值(Ct)计算mmp1、mmp3<sup>[8]</sup>基因的表达量。

引物序列如下:mmp1上游引物:5'-TTG GAGGGGATGCTCATT-3',下游引物:5'-ACACGCTTTT-GGGGTTTG-3';mmp3上游引物:5'-GCAGTTTGC-TCAGCCTATCC-3',下游引物:5'-TCCAGAGTGTCG-GAGTCCAG-3'。

#### 1.2.3 流式细胞术检测线粒体去极化情况

细胞培养、药物处理、UVA照射同1.2.1。UVA照射72 h后,胰酶消化使细胞悬浮,JC-1染色,流式细胞仪检测线粒体去极化情况。

### 1.3 统计学方法

每组实验至少重复3次。所有数据采用SPSS11.0分析软件分析,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计学分析组间比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

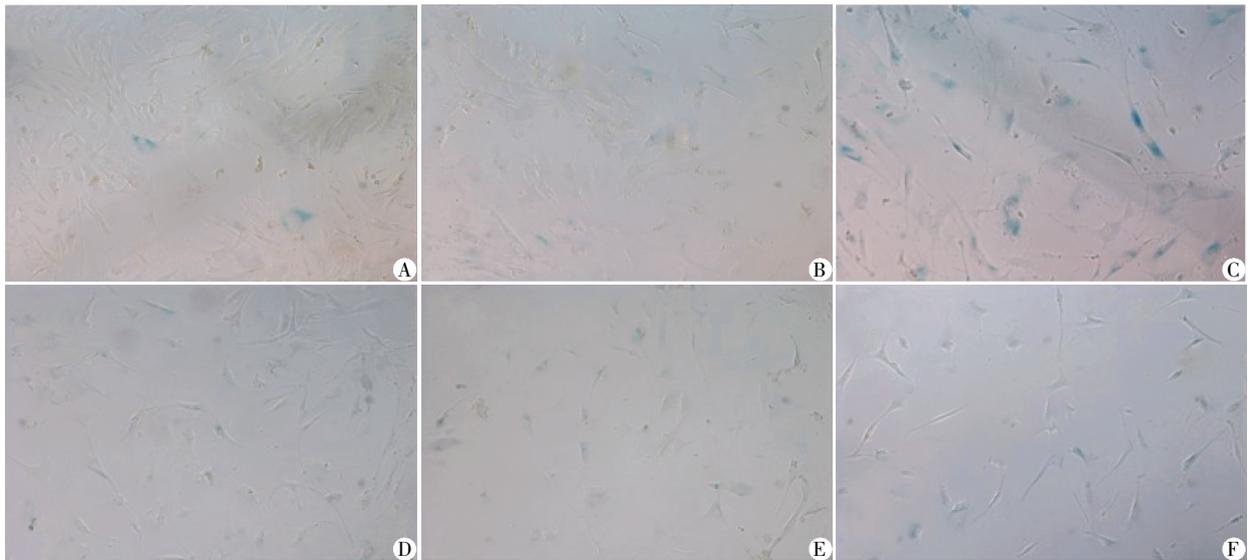
## 2 结果

### 2.1 低剂量的PQQ可降低UVA照射造成衰老细胞中 $\beta$ -半乳糖苷酶含量

低剂量UVA(9 J/cm<sup>2</sup>)照射经8-MOP(80 ng/ml)处理后的人皮肤成纤维细胞, $\beta$ -半乳糖苷酶表达量增加,加入低剂量PQQ组 $\beta$ -半乳糖苷酶含量有明显降低(图1,2),即50、100 ng/ml PQQ可以降低UVA造成的细胞衰老,而高浓度则这种作用消失。加入50 ng/ml PQQ后细胞染色百分比从78.24%降低到51.30%(图2,  $n = 3, P < 0.05$ )。

### 2.2 低剂量的PQQ降低UVA照射造成衰老细胞中衰老标志基因 mmp1、mmp3 的表达

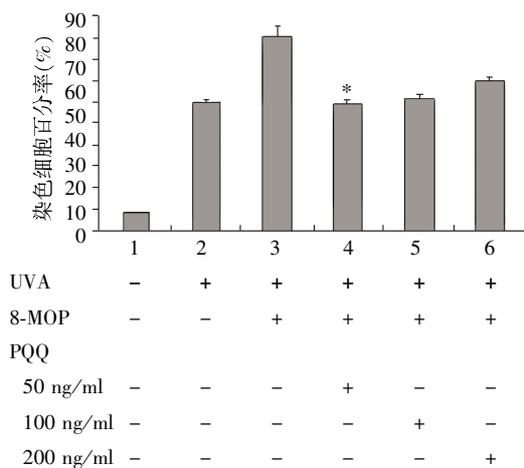
低剂量UVA(9 J/cm<sup>2</sup>)照射经8-MOP(80 ng/ml)处理后的人皮肤成纤维细胞,加入低剂量PQQ组细胞衰老标志基因mmp1、mmp3表达均呈下降趋



A: 未照 UVA、未加任何药物; B: 照射 UVA 但未加任何药物; C: 照射 UVA、加入 8-MOP; D: 照射 UVA、加入 8-MOP 和 50 ng/ml PQQ; E: 照射 UVA、加入 8-MOP 和 100 ng/ml PQQ; F: 照射 UVA、加入 8-MOP 和 200 ng/ml PQQ。

图 1 PQQ 对 UVA 照射后 HSF 细胞中  $\beta$ -半乳糖苷酶表达的影响

Figure 1 PQQ increased the expression of  $\beta$ -galactosidase in UVA irradiated HSF cells



与第 3 组比较, \* $P < 0.05$ 。

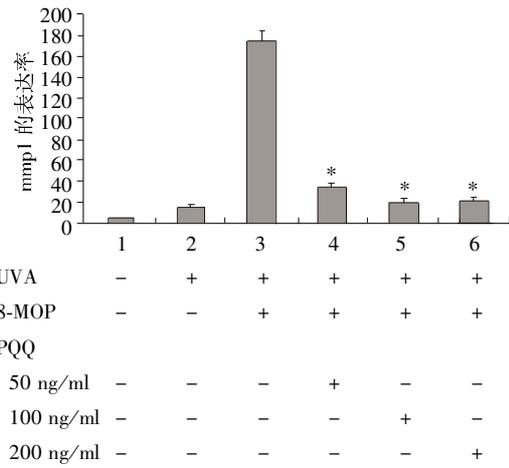
图 2 3 次  $\beta$ -半乳糖苷酶染色实验结果的平均值

Figure 2 SA- $\beta$ -Gal analysis of three times repeat experiment

势 (图 3,  $n = 3, P < 0.05$ ; 图 4,  $n = 3, P < 0.05$ ), 即 50、100 ng/ml PQQ 可以降低 UVA 造成的细胞衰老, 而高浓度的 PQQ 这种保护作用降低。

### 2.3 低剂量的 PQQ 降低 UVA 照射引起的线粒体去极化作用

低剂量 UVA ( $9 \text{ J/cm}^2$ ) 照射经 8-MOP (80 ng/ml) 处理后的人皮肤成纤维细胞, 加入低剂量 PQQ 组细胞中线粒体去极化状况降低。经 JC-1 染色、流式细胞仪检测, 加入 50 ng/ml PQQ 的细胞组, 线粒体去极化百分比从 39.09% 降低到 22.08% (图 5, 图 6,  $n = 3, P < 0.05$ )。



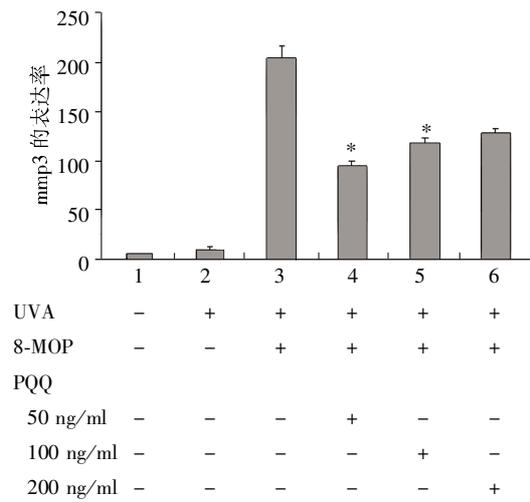
与第 3 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 3 PQQ 对 UVA 照射后 HSF 细胞中基因 mmp1 表达的影响

Figure 3 PQQ increased expression of gene mmp1 in UVA irradiated HSF cells

## 3 讨论

成纤维细胞是皮肤真皮中的主要细胞成分, 真皮衰老反映在细胞水平主要表现为成纤维细胞的衰老, 紫外线可加速衰老过程。本实验运用长波紫外线 (UVA 剂量:  $9 \text{ J/cm}^2$ ) 照射和加入 8-MOP (80 ng/ml) 构建人皮肤成纤维细胞 (HSF) 衰老模型, 研究 PQQ 对 UVA 造成的人皮肤成纤维细胞衰老的保护作用及其作用机制。



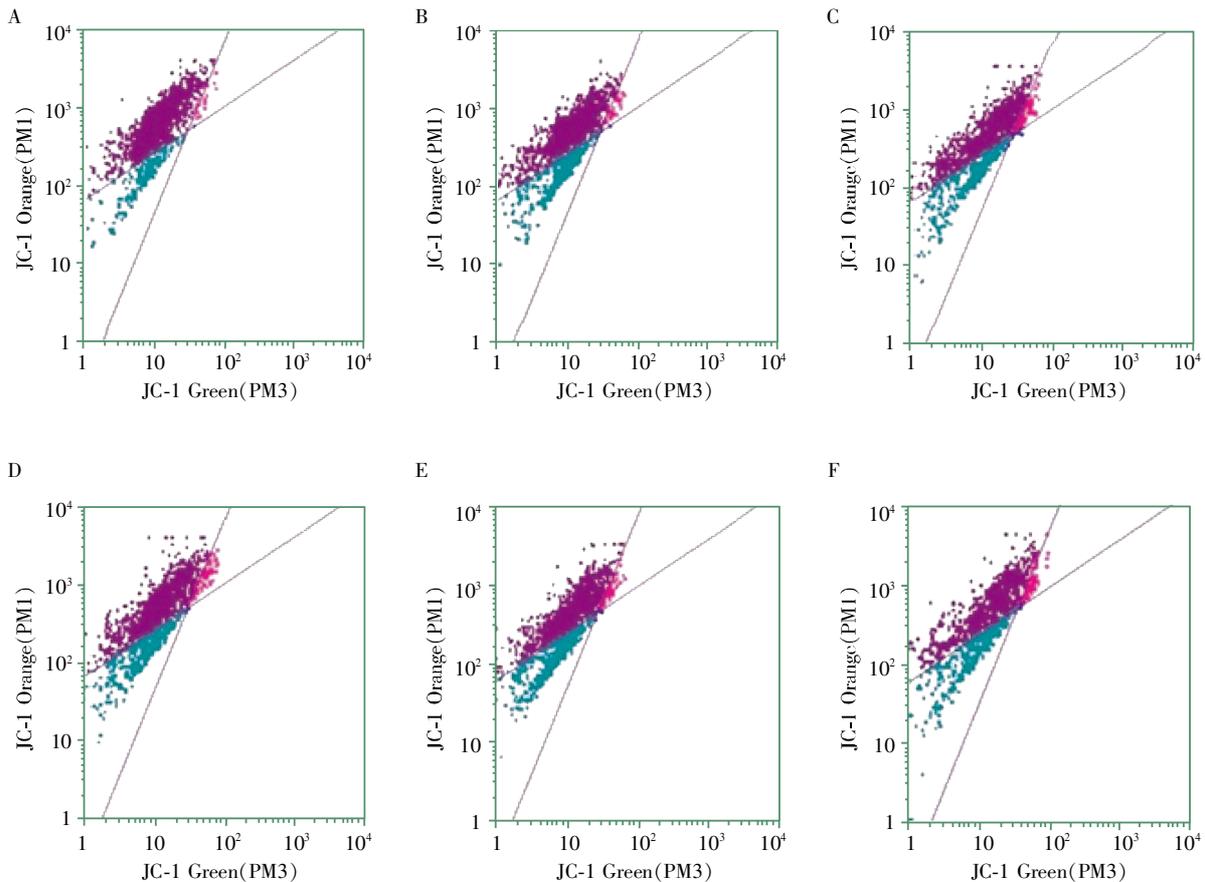
与第3组比较, \* $P < 0.05$ 。

图4 PQQ对UVA照射后HSF细胞中基因mmp3表达的影响

Figure4 PQQ increased expression of gene mmp3 in UVA irradiated HSF cells

本研究发现,低剂量PQQ对低剂量UVA造成皮肤衰老有保护作用,经8-MOP和UVA处理后衰老的HSF细胞,加入不同浓度的PQQ处理72h后,细胞衰老的指标都相对于未加入PQQ组有明显差异。细胞 $\beta$ -半乳糖苷酶染色着色率由78.24%降低到51.30%,细胞衰老标志基因mmp1、mmp3的表达明显下降,经JC-1染色、流式细胞仪检测加入低剂量PQQ实验组线粒体去极化有明显降低,由39.09%降低到22.08%,表明低剂量PQQ对UVA造成皮肤的衰老有明显保护作用。并且PQQ浓度对衰老也有影响,即50 ng/ml作用最为明显,100 ng/ml作用与50 ng/ml相同,浓度再次增加对细胞的衰老状况并没有改善,反而这种作用降低。

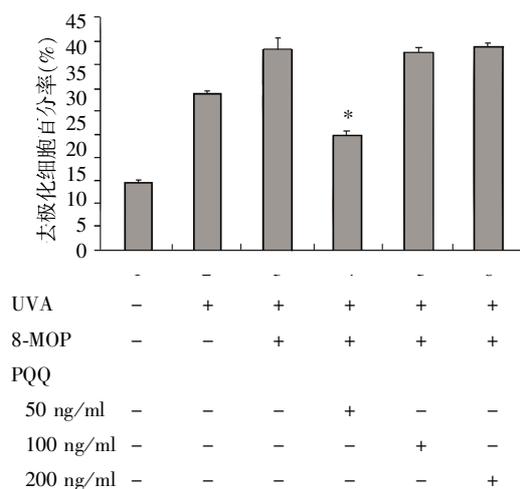
UVA可以通过多种途径引发皮肤细胞的衰老,目前自由基学说(free radical theory)和衰老的线粒体假说被普遍认可<sup>[9]</sup>。由于线粒体DNA(mtDNA)裸露,无组蛋白保护且缺乏有效的修复系统,易受外援



A:未照UVA、未加任何药物;B:照射UVA但未加任何药物;C:照射UVA、加入8-MOP;D:照射UVA、加入8-MOP和50 ng/ml PQQ;E:照射UVA、加入8-MOP和100 ng/ml PQQ;F:照射UVA、加入8-MOP和200 ng/ml PQQ。

图5 PQQ对UVA照射后HSF细胞中线粒体去极化的影响

Figure 5 PQQ decreased depolarization of mitochondria in UVA irradiated HSF cells



与第 3 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 6 3 次 JC-1 染色流式细胞仪检测结果的平均值

Figure 6 JC-1 staining analysis of three times repeat experiment

因素的影响而发生突变, 并且在细胞内积累<sup>[10-11]</sup>。mtDNA 突变在人类衰老及许多退行性疾病中的作用已被广泛证实, mtDNA 突变及积累也被认为是导致人体皮肤老化尤其是皮肤光老化的重要原因<sup>[12]</sup>。本实验用 JC-1 染色线粒体, 发现衰老的人皮肤成纤维细胞中的线粒体去极化增加, 而加入 PQQ 组, 这种去极化情况有明显的好转。说明 PQQ 保护细胞应对 UVA 的损伤时通过线粒体这条通路的, 为研究 PQQ 保护皮肤作用提供了一定依据, 也为研究皮肤衰老和抗衰老药物提供了实验依据。但是 PQQ 通过线粒体发挥这一保护作用具体是通过哪些蛋白发挥作用还有待进一步探索研究。

[参考文献]

[1] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure function and biotechnologies applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58(1): 13-22  
 [2] Matsui MS, DeLeo VA. Long wave ultraviolet radiation and

promotion of skin cancer[J]. Cancer Cells, 1991, 58(1): 8-12  
 [3] Matsushita K, Toyama H, Yamada M, et al. Quinoproteins: structure function and biotechnologies applications [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 26(1): 13-22  
 [4] Mitchell AE, Jones AD, Mercer RS, et al. Characterization of pyrroloquinoline quinone amino acid derivatives by electrospray ionization mass spectrometry and detection in human milk[J]. Anal Biochem, 1999, 269(1): 317-325  
 [5] Ouchi A, Nakano M, Nagaoka S, et al. Kinetic study of the antioxidant activity of pyrroloquinoline quinone (PQQH<sub>2</sub>), a reduced form of pyrroloquinoline quinone in micellar solution[J]. Agric Food Chem, 2009, 57(2): 450-456  
 [6] Kasahara T, Kato T. Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for animals[J]. Nature, 2003, 422(6934): 832  
 [7] Herrmann G, Brenneisen P, Walschek M, et al. Psoralen photoactivation promotes morphological and functional changes in fibroblasts in vitro reminiscent of cellular senescence[J]. Cell Science, 1998, 111(1): 759-767  
 [8] 郭娟菲, 周炳荣, 李巍, 等. UVB 诱导下早衰皮肤成纤维细胞中 miR-34c 及 SIRT1 表达研究[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2011, 31(9): 1289-1293  
 [9] Harman D. Ageing: a theory based on free radical and radiation chemistry[J]. Gerontol, 2002, 11(37): 298-300  
 [10] Harman D. Free radical of ageing: a update: increasing the functional life span[J]. Ann NY Acad, 2006, 1067(1): 10-21  
 [11] Sohal RS, Mockett HJ, On-WC. Mechanism of ageing: all appraisal of the oxidative stress hypothesis [J]. Free Radic Boil Med, 2002, 33(5): 575-586  
 [12] Suganuma K, Nakajima H, Ohtsuki M, et al. Astaxanthin attenuates the UVA-induced up-regulation of matrix-metalloproteinase-1 and skin fibroblast elastase in human dermal fibroblasts [J]. Dermatological Science, 2010, 58(2): 136-142

[收稿日期] 2012-11-13